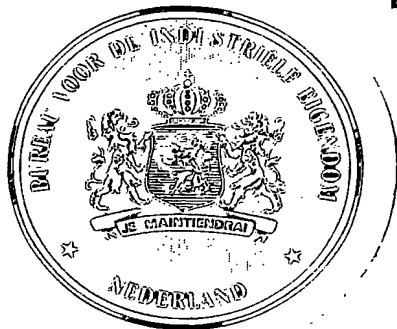
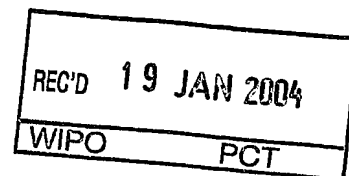


KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom



Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 12 december 2002 onder nummer 1022153,
ten name van:

**NEDERLANDSE ORGANISATIE VOOR TOEGEPAST-
NATUURWETENSCHAPPELIJK ONDEZOEK TNO**

te Delft

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Cholesterol verlagend preparaat, voedingssupplement en voedingsmiddel en werkwijzen voor
de bereiding daarvan",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 8 januari 2004

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,
voor deze,

Mw. M.M. Enhus

**PRIORITY
DOCUMENT**

BEST AVAILABLE COPY

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

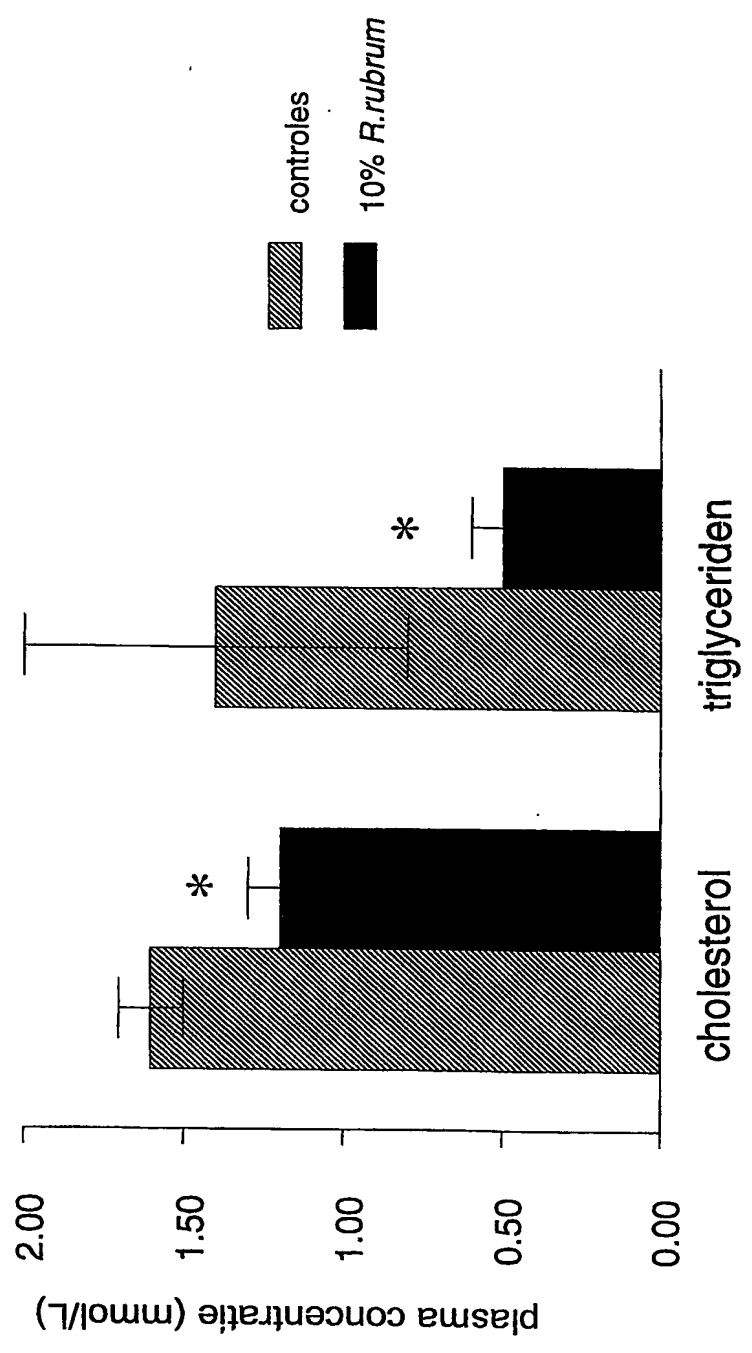
1022153

B. v.d. I.E.

12 DEC. 1952

UITTREKSEL

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op cholesterolverlagende middelen, en meer in het bijzonder op een bacteriepreparaat voor toepassing in een geneesmiddel voor het verlagen van de cholesterolspiegel in bloed. De onderhavige uitvinding verschaft onder andere een preparaat van *Rhodospirillum* spp. met cholesterol verlagende eigenschappen, evenals werkwijzen voor de bereiding en de toepassing daarvan.



P48514NL00

Titel: Cholesterol verlagend preparaat, voedingssupplement en voedingsmiddel en werkwijzen voor de bereiding daarvan.

De uitvinding heeft betrekking op cholesterolverlagende middelen, en meer in het bijzonder op een bacteriepreparaat voor toepassing in een geneesmiddel voor het verlagen van de cholesterolspiegel in bloed. De onderhavige uitvinding verschaft een dergelijk preparaat, een
5 voedingssupplement voorzien van een dergelijk preparaat, een voedingsmiddel waarin een dergelijk voedingssupplement is verwerkt, en werkwijzen voor de bereiding daarvan.

Hart- en vaatziekten worden veroorzaakt door een aantal, elkaar versterkende, factoren, waarvan een (te) hoog cholesterolniveau in het bloed
10 als de belangrijkste gezien wordt. Cholesterol is een belangrijke bouwsteen van dierlijke en menselijke cellen daar het één van de bestanddelen is van cellulaire membranen. De menselijke cel kan cholesterol zelf synthetiseren, maar cholesterol wordt ook opgenomen uit de voeding. Beide processen spelen bij de mens een belangrijke rol in het cholesterolmetabolisme.

15 Naast deze essentiële functie van cholesterol als bouwsteen van cellulaire membranen speelt cholesterol bij de mens ook een negatieve rol bij het ontstaan van hart- en vaatziekten (zoals bv hartinfarcten, beroertes en perifere vaatziekten), in het bijzonder in relatie tot het optreden van aderverkalking (atherosclerose) in de wand van bloedvaten. Een verhoogde
20 cholesterolspiegel in het bloed is de belangrijkste voorspellende (risico)factor voor het optreden van hart- en vaatziekten en atherosclerose.

In het bloed wordt cholesterol vervoerd in lipoproteïnen, die in een aantal klassen onderscheiden kunnen worden op basis van grootte en soortelijk gewicht. De very-low density lipoproteïnen (VLDL), de
25 intermediate-density lipoproteïnen (IDL), de low-density lipoproteïnen (LDL) en de high-density lipoproteïnen (HDL) zijn daarvan de belangrijkste.

Uit experimenteel en klinisch onderzoek is gebleken dat vooral de hoeveelheid cholesterol die vervoerd wordt in de VLDL, de IDL en de LDL een risicofactor is voor het optreden van hart- en vaatziekten (het pro-atherogene cholesterol). Het in de HDL voorkomende cholesterol heeft daarentegen een beschermend effect op het ontstaan van hart- en vaatziekten (het anti-atherogene cholesterol).

Gerandomiseerde prospectieve klinische studies hebben aangetoond dat verlaging van de plasmacholesterolspiegel een gunstig effect heeft op de incidentie van hart- en vaatziekten en op de sterfte als gevolg van deze ziekten. Voorwaarde hierbij is wel dat deze verlaging een gevolg is van verlaging van het pro-atherogene cholesterol in VLDL, IDL en/of LDL. Voor het bestrijden en voorkomen van hart- en vaatziekten bij de mens is het gewenst het pro-atherogene cholesterol te verlagen, en het aandeel anti-atherogene cholesterol absoluut of relatief te verhogen.

In de praktijk staan een aantal wegen open om het plasmacholesterol te verlagen. De belangrijkste hiervan zijn:

- a. remmen van de cholesterol synthese in het lichaam;
- b. verhogen van de afvoer van cholesterol (of zijn omzettingsprodukten, voornamelijk galzuren) naar de darm; en
- c. verminderen van de opname (absorptie) van cholesterol en galzuren uit het maag-darmkanaal.

Geneesmiddelen die momenteel worden toegepast voor het remmen van de cholesterol synthese grijpen in veel gevallen aan op het enzym hydroxymethyl-glutaryl-coenzyme A-reductase (HMGCoA reductase) dat het snelheidsbepalend enzym is in de syntheseroute van cholesterol. Deze zgn. statines zijn over het algemeen synthetische verbindingen die de enzymwerking blokkeren. Voorbeelden hiervan zijn simvastatine ("Zocor®"), pravastatine ("Pravachol®") en atorvastatine ("Lipitor®"). De statines zijn afgeleide verbindingen van metabolieten die van nature in schimmels voorkomen.

Om de afvoer van cholesterol te verhogen kan een galzuren-adsorberende hars gebruikt worden (cholestyramine, "Questran®"). Door de adsorptie van galzuren aan deze hars neemt de secretie van galzuren in de faeces toe en neemt de reabsorptie van galzuren uit het darmlumen naar het bloed af, waardoor er een tekort aan galzuren in het lichaam ontstaat. Dit tekort wordt door het lichaam opgeheven doordat de lever meer cholesterol in galzuur gaat omzetten. Hierdoor wordt cholesterol uit het lichaam afgevoerd als galzuur.

Omdat de opname van cholesterol uit het darmlumen eigenlijk alleen mogelijk is als het cholesterol door galzuur in het lumen in oplossing gehouden wordt, leidt verlaging van de galzuurconcentratie in de darm ook tot een verminderde absorptie van cholesterol.

Geneesmiddelen die de (actieve) absorptie van cholesterol uit het darmlumen remmen middels het remmen van celtransportsystemen voor cholesterol (en eventueel andere sterolen) in het darmepitheel zijn grotendeels nog in ontwikkeling. Eén daarvan (Ezetimibe®) is sinds kort in enkele landen verkrijgbaar, andere worden in de kliniek alleen nog experimenteel toegepast.

Naast geneesmiddelen kunnen bovengenoemde drie doeleinden ook nagestreefd worden met andere in de natuur voorkomende of uit natuurlijke producten afgeleide middelen (cf Hassel. 1998. Curr. Opin. Lipidol. 9:7-10). Een natuurlijk voorkomend statine-bevattend preparaat is de zgn. rode rijst, een rijstsoort waarop een schimmel groeit die van nature de metaboliet lovastatine maakt. Deze metaboliet is gelijk aan het cholesterolsynthese-remmende medicament lovastatine. Verder kunnen bijvoorbeeld in planten voorkomende sterolen, de zgn phytosterolen, de opname van galzuren en cholesterol uit de darm remmen. Praktische toepassing vinden dit type verbindingen momenteel in margarines als "Benecol®" of "Becel Pro-actif®".

Er is echter nog steeds behoefte aan cholesterol verlagende preparaten, met name toegepast in de voedingsmiddelenindustrie, en bij voorkeur gericht op menselijke voeding.

5 Verrassenderwijs is nu gevonden dat toevoeging van een gevriesdroogd *Rhodospirillum rubrum* (*R. rubrum*) preparaat aan de voeding van proefdieren, het cholesterolniveau in het bloedplasma van deze dieren aanmerkelijk doet verlagen. In een eerste uitvoeringsvorm verschaft de uitvinding een preparaat van *Rhodospirillum* spp. voor toepassing in een geneesmiddel.

10 In een tweede uitvoeringsvorm heeft de onderhavige uitvinding betrekking op een farmaceutisch preparaat omvattende een preparaat van *Rhodospirillum* spp. en één of meer excipiëntia.

In een derde uitvoeringsvorm heeft de onderhavige uitvinding betrekking op een cholesterol verlagend middel omvattende een preparaat
15 van *Rhodospirillum* spp.

In een vierde uitvoeringsvorm heeft de onderhavige uitvinding betrekking op de toepassing van een preparaat van *Rhodospirillum* spp. voor de vervaardiging van een geneesmiddel voor het verlagen van de cholesterolspiegel in bloed.

20 In een vijfde uitvoeringsvorm heeft de onderhavige uitvinding betrekking op een voedingssupplement met cholesterolverlagende eigenschappen omvattende een preparaat van *Rhodospirillum* spp. Een dergelijke uitvoeringsvorm kan tevens een voedingssupplement omvatten met levende *Rhodospirillum* spp. waardoor een probioticum wordt
25 verkregen.

In een zesde uitvoeringsvorm voorziet de onderhavige uitvinding in een voedingsmiddel omvattende een voedingssupplement volgens de uitvinding.

Verder uitvoeringsvormen hebben betrekking op werkwijzen voor de bereiding van preparaten, voedingssupplementen en voedingsmiddelen volgens de uitvinding.

5 Figuur 1 toont het effect van een voeding met 10 gew.% *R. rubrum* op plasma cholesterol en triglyceriden in Wistar ratten, zoals uiteengezet in Voorbeeld 2. * betekent $p < 0,005$ t.o.v. controles.

10 Figuur 2 toont de scheiding van de lipoproteïnenfractie (m.b.v. fast-protein-liquid-chromatography) uit plasma van normaal gevoede ratten, en van ratten gevoed met voer waarin 10 gew.% *R. rubrum* aanwezig was, zoals uiteengezet in Voorbeeld 2.

Figuur 3 toont het effect van een voeding met 10 gew.% *R. rubrum* op plasma cholesterol en triglyceriden in muizen, zoals uiteengezet in Voorbeeld 3. * betekent $p < 0,003$ t.o.v. controles.

15 Figuur 4 toont het effect van een voeding met 10 gew.% *R. rubrum* op plasma cholesterol en triglyceriden in muizen, zoals uiteengezet in Voorbeeld 4. * betekent $p < 0,0003$ t.o.v. controles, ** betekent $p < 0,011$ t.o.v. controles.

20 Figuur 5 toont de lipoproteïnenpatronen in plasma van C57Bl/6 muizen na voeren met "Western-type" dieet voedsel met en zonder 10 gew.% *R. rubrum* (scheiding m.b.v. fast-protein-liquid-chromatography), zoals uiteengezet in Voorbeeld 4.

25 Figuur 6 toont het effect van verschillende concentraties *R. rubrum* in "Western-type" dieet voedsel op het plasma cholesterol (gem \pm sd) na één en twee weken, zoals uiteengezet in Voorbeeld 5. * betekent na 2 weken significant verschillend van controles ($p < 0,001$ t.o.v. 0 gew.% *R. rubrum*), ** betekent na 1 week significant verschillend van controles ($p < 0,001$ t.o.v. 0 gew.% *R. rubrum*),.

Figuur 7 toont de scheiding van de lipoproteïnenfractie (m.b.v. fast-protein-liquid-chromatography) uit plasma van APOE*3-Leiden muizen

gevoed met "Western-type" dieet voedsel waaraan verschillende hoeveelheden *R. rubrum* was toegevoegd, zoals uiteengezet in Voorbeeld 5.

5 Figuur 8 toont het effect op plasma cholesterol en lathosterol van twee weken voeren met "Western-type" dieet voedsel waaraan verschillende hoeveelheden *R. rubrum* was toegevoegd, zoals uiteengezet in Voorbeeld 5. * betekent significant verschillend van controles (0 gew.% *R. rubrum*).

10 Figuur 9 toont het effect op plasma cholesterol en beta-sitosterol van twee weken voeren met "Western-type" dieet voedsel waaraan verschillende hoeveelheden *R. rubrum* was toegevoegd, zoals uiteengezet in Voorbeeld 5.

Figuur 10a toont de synthese van VLDL-triglyceriden in muizen gevoed met "Western-type" dieet voedsel waaraan verschillende hoeveelheden *R. rubrum* was toegevoegd, zoals uiteengezet in Voorbeeld 5.

15 Figuur 10b toont de lipidensamenstelling van VLDL in muizen gevoed met "Western-type" dieet voedsel waaraan verschillende hoeveelheden *R. rubrum* was toegevoegd, zoals uiteengezet in Voorbeeld 5.

Figuur 11 toont de excretie van neurale sterolen in de faeces van muizen gevoed met "Western-type" dieet voedsel waaraan verschillende hoeveelheden *R. rubrum* was toegevoegd, zoals uiteengezet in Voorbeeld 5.

20 Figuur 12 toont de excretie van galzuren in de faeces van muizen gevoed met "Western-type" dieet voedsel waaraan verschillende hoeveelheden *R. rubrum* was toegevoegd, zoals uiteengezet in Voorbeeld 5.

25 Figuur 13 toont de excretie van neurale sterolen plus galzuren in de faeces van muizen gevoed met "Western-type" dieet voedsel waaraan verschillende hoeveelheden *R. rubrum* was toegevoegd, zoals uiteengezet in Voorbeeld 5.

30 *Rhodospirillum* is een geslacht van de familie Rhodospirillaceae, een familie van purperen niet-zwavel bacteriën (purple non-sulphur bacteria). De rhodospirillen worden o.a. gekenmerkt doordat zij fototroof zijn en zowel aëroob (met zuurstof) als anaëroob kunnen groeien, waarbij licht

als energiebron wordt gebruikt. De bacterie bevat hiervoor chlorofyl b. Binnen het geslacht worden thans zes soorten onderscheiden, te weten *Rhodospirillum rubrum* (Imhoff en Trüper, 1992), *Rhodospirillum centenum*, *Rhodospirillum fulvum*, *Rhodospirillum molischianum*,
 5 *Rhodospirillum tenue* en *Rhodospirillum photometricum* en een drietal soorten die niet als zodanig officieel erkend worden, te weten *Rhodospirillum salexigens*, *Rhodospirillum salinarum* en *Rhodospirillum sodomense*.

Rhodospirillum rubrum komt o.a. voor in natuurlijke wateren, in
 10 modder en in zuiveringsinstallaties en wordt o.a. toegepast in de waterzuivering en voor biomassaproductie als grondstof van diervoeding, zoals bijvoorbeeld als voer voor kippen en vissen, en kunstmest. Biomassa van fototrofe bacteriën wordt beschouwd als een goede grondstof voor diervoer omdat het rijk is aan vitaminen en aminozuren.

15 Het gebruik van *Rhodospirillum* spp. in diervoeding is reeds enige tijd bekend (Imhoff JF, Trüper HG. The genus *Rhodospirillum* and related genera. Chapter 101 in: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H. The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. Springer-Verlag, New
 20 York/Berlin/Heidelberg, Volume III, 2nd edition 1992, pp. 2141-2155). De onderhavige uitvinders hebben echter verrassenderwijs gevonden dat *Rhodospirillum* spp. een belangrijke bijdrage kan leveren in de preventie van hart- en vaatziekten door het cholesterolgehalte (de cholesterolspiegel) in bloed en/of serum te verlagen.

25 Een cholesterol verlagende eigenschap is in de onderhavige uitvinding gedefinieerd als een eigenschap van een samenstelling, preparaat, voedingssupplement of voedingsmiddel waardoor het cholesterol gehalte in bloedserum wordt verlaagd. Werkwijzen voor het meten van cholesterol in bloedserum zijn bij de vakman bekend.

Een preparaat van *Rhodospirillum* spp. is hierin gedefinieerd als een door een bepaalde bewerking toebeide hoeveelheid celmateriaal van een *Rhodospirillum* spp. Een preparaat van *Rhodospirillum* spp. kan in uitvoeringsvormen volgens de uitvinding bijvoorbeeld een extract, of een uit
 5 gehele cellen geïsoleerd bestanddeel met cholesterol verlagende eigenschappen, of een concentraat van gehele cellen, of een concentraat van gebroken celfragmenten omvatten. Tevens kan een preparaat volgens de uitvinding een *Rhodospirillum* spp. in gevriesdroogde vorm omvatten, waarbij de cellen in hoofdzaak in leven blijven en het vermogen behouden
 10 om zich bij geschikte omstandigheden te delen.

In een preparaat van *Rhodospirillum* spp. volgens de uitvinding kan zeer geschikt één enkele soort uit het geslacht *Rhodospirillum* worden toegepast, maar ook een mengsel van verschillende *Rhodospirillum* spp. als
 15 *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospirillum centenum*, *Rhodospirillum fulvum*, *Rhodospirillum molischianum*, *Rhodospirillum salexigens*, *Rhodospirillum salinarum*, *Rhodospirillum sodomense*, *Rhodospirillum tenue* en/of *Rhodospirillum photometricum* kan worden toegepast. Bij voorkeur omvat een preparaat van *Rhodospirillum* spp. volgens de uitvinding een preparaat van *Rhodospirillum rubrum*, bij grote voorkeur *Rhodospirillum rubrum*
 20 stam ATCC 25903.

Een preparaat van *Rhodospirillum* spp. omvat in uitvoeringsvormen van de uitvinding zeer geschikt 20-100 gew.%, bij voorkeur 40-100 gew.%, bij grote voorkeur 60-100 gew.%, bij nog grotere voorkeur 80-100 gew.% aan celmateriaal van *Rhodospirillum* spp. Een
 25 preparaat kan verder bestanddelen omvatten die samenhangen met de aard van de voor de verkrijging ervan gebruikte toebereidingsvorm. Zo kan een preparaat bijvoorbeeld nog water bevatten of, in het geval van een gevriesdroogd preparaat, bijvoorbeeld nog glycerol of sucrose.

In een voorkeursuitvoeringsvorm wordt voor de samenstelling van
 30 een preparaat van *Rhodospirillum* spp. een gevriesdroogd preparaat droog

gemengd met vulmiddelen, zoals microkristallijne cellulose (MCC) of mannitol, bindmiddel, zoals hydroxypropylcellulose (HPC), en/of smeermiddelen, zoals stearinezuur en/of andere excipiëntia en in de vorm van een droog poeder getabletteerd, of anderszins in een voor toediening
5 bruikbare vorm gebracht.

Een dergelijk preparaat van *Rhodospirillum* spp. is zeer geschikt voor toepassing in een geneesmiddel of farmaceutisch preparaat voor de verlaging van de cholesterolspiegel in bloedserum, bij voorkeur in het bloedserum van mensen. Het preparaat kan zowel levende cellen van
10 *Rhodospirillum* spp. omvatten als ook dode cellen, celresten, e.d.

Alternatieve uitvoeringsvormen voor een preparaat volgens de uitvinding zijn tevens mogelijk. Zo kan bijvoorbeeld een preparaat van *Rhodospirillum* spp. worden verschaft als een vloeibaar preparaat waarin de vaste bestanddelen in een water-bevattende vloeistof gesuspendeerd,
15 gedispergeerd of geëmulgeerd zijn. Een dergelijke samenstelling kan direct als preparaat volgens de uitvinding worden toegepast of in een alternatieve uitvoeringsvorm tot een voedingssupplement worden verwerkt.

In de onderhavige uitvinding is een voedingssupplement gedefinieerd als een samenstelling die aanvullend aan de normale voeding
20 kan worden geconsumeerd en die bestanddelen omvat die niet, in geringe mate of in onvoldoende mate in de normale voeding voorkomen en waarvan voldoende of verhoogde consumptie gewenst is. Bij voorkeur is een voedingssupplement een voor menselijke consumptie geschikte samenstelling. Dat betekent dat een voedingssupplement volgens de
25 onderhavige uitvinding bij voorkeur voor menselijke consumptie geschikte eigenschappen bezit zoals bijvoorbeeld textuur, smaak en reuk, maar bijvoorbeeld ook voedingswaarde.

In een uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding omvat een voedingssupplement met cholesterolverlagende eigenschappen een
30 preparaat van *Rhodospirillum* spp.

Een voedingssupplement volgens de uitvinding kan geschikt 0,1 tot 99,9 gew.% van een preparaat van *Rhodospirillum* spp. omvatten. Bij voorkeur omvat een voedingssupplement 10 tot 90 gew.%, bij grotere voorkeur 30 tot 75 gew.% van een preparaat van *Rhodospirillum* spp.

5 Om een voedingssupplement omvattende een preparaat van *Rhodospirillum* spp. geschikt te maken voor consumptie kunnen daaraan bestanddelen die bijvoorbeeld de textuur, smaak of geur verbeteren aan worden toegevoegd. Zo kan een voedingssupplement volgens de uitvinding tevens (additionele) bronnen van eiwit, koolhydraat en vet, alsmede
10 vitaminen, mineralen, electrolieten, sporenelementen, en andere geschikte toevoegingen omvatten, zodanig dat het voedingssupplement zelf als een volwaardig voedingsmiddel kan worden gebruikt.

Als bron van eiwit kan in principe ieder eiwit dat geschikt is voor toepassing in voedingsformuleringen en mengsels daarvan worden
15 toegepast in een voedingssupplement volgens de uitvinding. Dergelijke eiwitten omvatten bijvoorbeeld dierlijk eiwit, zoals wei-eiwit, wei-eiwit concentraat, wei poeder, ei-eiwit, ei-albumine, caseïne of melkalbumine, en plantaardig eiwit, zoals soja-eiwit, sojameel of eiwit uit sojamelk. Bij de keuze van de eiwitbron kan de biologische waarde van het eiwit een
20 belangrijk criterium zijn waarbij bijvoorbeeld caseïnaat, waaronder calcium caseïnaat, maar tevens wei, melkalbumine, ei-albumine en gehele ei-eiwitten tot de eiwitten met de hoogste biologische waarde behoren, omdat zij een hoog gehalte aan essentiële aminozuren bevatten.

Geschikte koolhydraten voor toepassing in een voedingssupplement
25 volgens de uitvinding omvatten bijvoorbeeld simpele korte keten koolhydraten zoals mono- en disacchariden maar tevens polysacchariden, of een combinatie daarvan. Een suiker kan worden gekozen vanwege gewenste organoleptische eigenschappen. Een complex polysaccharide kan bijvoorbeeld geschikt worden toegepast als voedingsvezel. Een
30 voedingssupplement volgens de uitvinding kan in bepaalde

uitvoeringsvormen ook combinaties van complexe en simpele koolhydraten omvatten.

Als vetten kunnen in principe alle mogelijke voor consumptie geschikte vetten en oliën worden toegepast.

5 Vitaminen en mineralen kunnen bijvoorbeeld worden toegevoegd aan de samenstelling conform de geldende regelgeving van gezondheidsautoriteiten en kunnen alle door die instanties aanbevolen vitaminen en mineralen omvatten, zoals de vitaminen A, B1, B2, B12, folinezuur, niacine, panthoteenzuur, biotine, C, D, E en K. Als mineralen
10 kunnen bijvoorbeeld ijzer, zink, jodium, calcium, magnesium, chroom en selenium worden toegevoegd.

Electrolieten als natrium, kalium en chloriden, en sporenelementen en ander toevoegingen kunnen eveneens zijn omvat in een voedingssupplement volgens de uitvinding en worden, indien daarin
15 aanwezig, bij voorkeur toegepast in de voor deze stoffen aanbevolen hoeveelheden. Tevens kan een voedingssupplement volgens de uitvinding bestanddelen omvatten zoals textuur verbeterende bestanddelen, kleurstoffen, geurstoffen, smaakstoffen, specerijen, vulmiddelen, emulgatoren, stabiliseringsmiddelen, conserveermiddelen, anti-oxidanten,
20 voedingsvezels, en andere voedingssupplementen als aminozuren, choline, lecithine, vetzuren etc. De keuze voor dergelijke bestanddelen is een kwestie van formulering, ontwerp en voorkeur. De hoeveelheden die van dergelijke bestanddelen kunnen worden toegevoegd zijn bij de vakman bekend, waarbij de keuze bijvoorbeeld geleid kan worden door de aanbevolen
25 dagelijkse hoeveelheden (RDA doseringen) voor kinderen en volwassenen.

Emulgatoren kunnen worden toegevoegd voor stabiliteit van het eindproduct. Voorbeelden van geschikte emulgatoren omvatten bijvoorbeeld lecithine (e.g., van ei of soja), en/of mono- en di-glycerides. Als stabiliseringsmiddelen kunnen bijvoorbeeld carobe, guar en carreegom
30 worden toegepast.

Conserveermiddelen kunnen eveneens worden toegevoegd ter verlenging van de houdbaarheid van het product. Bij voorkeur worden conserveermiddelen als kaliumsorbaat, natriumsorbaat, kaliumbenzoesaat, natriumbenzoesaat of calcium dinatrium EDTA toegepast.

5 In aanvulling op de bovenvermelde koolhydraten kan het voedingssupplement natuurlijke of synthetische zoetstoffen omvatten zoals saccharides, cyclamaten, aspartamine, aspartaam, acesulfaam K, en/of sorbitol.

10 Porties voor inname van het voedingssupplement kunnen in omvang variëren en zijn niet beperkt tot de waarden die behoren bij de aanbevolen hoeveelheden. De term "voedingssupplement" is hierin niet bedoeld te zijn beperkt tot een specifiek gewicht of specifieke dosering van het voedingssupplement.

15 Een samenstelling van een voedingssupplement volgens de uitvinding kan in principe iedere vorm aannemen die geschikt is voor consumptie door mensen of dieren. In een voorkeursuitvoeringsvorm is de samenstelling in de vorm van een droog poeder dat te suspenderen, te dispergeren of te emulsifieren is in een waterbevattende vloeistof zoals water, koffie, thee, bouillon of vruchtensap. Hiertoe kan een dergelijk
20 poeder in een doseerverpakking worden verschaft.

In een alternatieve voorkeursuitvoeringsvorm wordt de samenstelling in de vorm van een droog poeder getabletteerd. Daartoe kan een samenstelling voor een voedingssupplement volgens de uitvinding zeer geschikt worden voorzien van vulmiddelen, zoals microkristallijne cellulose
25 (MCC) en mannitol, bindmiddel, zoals hydroxypropylcellulose (HPC), en smeermiddelen, zoals stearinezuur of andere excipiëntia.

Een samenstelling van een voedingssupplement volgens de uitvinding kan tevens worden verschaft in een vloeibaar voedingspreparaat waarin de vaste bestanddelen in een water-bevattende vloeistof
30 gesuspenderd, gedispergeerd of geëmulgeerd zijn. Een dergelijke

samenstelling kan direct door een voedingsmiddel worden gemengd of kan bijvoorbeeld geëxtrudeerd worden en verwerkt tot korrels of andere vormen.

In een alternatieve uitvoeringsvorm kan een voedingssupplement in de vorm van een vast voedingsmiddel, zoals een reep, koekje of een
5 broodje zijn uitgevoerd.

Een voedingssupplement wordt bij voorkeur toegepast als een oraal in te nemen samenstelling, eventueel in combinatie met een acceptabele drager, zoals een capsule, een tablet, een met water mengbaar poeder, een verdunning of een andere toedieningsvorm, maar kan tevens worden
10 verwerkt in een voedingsmiddel.

Verwerking van een voedingssupplement in een voedingsmiddel heeft als voordeel dat het voedingssupplement zelf als betrekkelijk eenvoudige formulering kan worden vervaardigd omdat de smaak en textuur bij consumptie ervan voornamelijk worden bepaald door het
15 voedingsmiddel waarin het voedingssupplement is verwerkt.

Andere aspecten van de onderhavige uitvinding betreffen werkwijzen voor de bereiding van een preparaat, een voedingssupplement en een voedingsmiddel volgens de uitvinding.

Een werkwijze voor de bereiding van een preparaat volgens de
20 uitvinding kan zeer geschikt de stappen omvatten van het opkweken van cellen van één of meer *Rhodospirillum* spp. tot een culture, het oogsten van genoemde culture en het verwerken van de cellen van genoemde culture tot een preparaat.

Details van een dergelijke werkwijze staan o.a. beschreven in de
25 hieronder beschreven voorbeelden. De vakman zal begrijpen dat verschillende alternatieve uitvoeringsvormen voor dergelijk werkwijzen kunnen worden gebruikt.

Bij het opkweken van de *Rhodospirillum* cellen worden bij voorkeur anaërobe omstandigheden en fototrofe groeicondities aangelegd.
30 Als koolstofbron kunnen verschillende organische voedingsstoffen worden

toegepast. Zeer geschikte media en groeicondities voor het opkweken van de *Rhodospirillum* cellen zijn o.a "Segers en Verstraete medium" (Segers L, Verstraete W. Conversion of organic acids to H₂ by Rhodospirillaceae grown with glutamate or dinitrogen as nitrogen source. Biotechnol Bioeng 1983; 25: 2843-2853), met melkzuur (ca. 2,7 gram/liter) als koolstofbron, bij een pH van ongeveer 6,8-6,9 en bij een temperatuur van 25-37°C, bij voorkeur aangepast aan de specifieke eisen van het betreffende organisme, bij constante belichting met bijvoorbeeld tl-licht (lichtintensiteit 300 μM quanta. m^{-2} . s^{-1}) en onder anaërobe condities. Andere geschikte media voor het kweken van *Rhodospirillum* spp. zijn bijvoorbeeld "Modified Rhodospirillaceae Medium" (DSMZ medium no. 27, DSMZ GmbH Braunschweig, Duitsland) en Cens Medium (DSMZ medium no. 748). De cellen kunnen zeer geschikt worden opgekweekt tot een dichtheid van 0,01-50 mg/ml, bij voorkeur ongeveer 1-5 mg natgewicht /ml.

Na het bereiken van een geschikte celdichtheid kunnen de cellen worden verwerkt tot een preparaat volgens de uitvinding door hen van het groeimedum af te scheiden of te oogsten middels bijvoorbeeld centrifugatie of filtratie. De geconcentreerde celmassa kan direct of na verdere bewerking als een preparaat in de onderhavige uitvinding worden toegepast.

Verdere bewerkingen voor toebereiding van celmateriaal van *Rhodospirillum* spp. ter verkrijging van een geschikt preparaat daarvan kunnen bijvoorbeeld een wasstap omvatten, maar kunnen ook het verder verwerken van de cellen tot een extract omvatten.

Bij voorkeur worden de cellen na het oogsten drooggevroren waardoor zij in hoofdzaak levend blijven. Een preparaat volgens de uitvinding omvat daarom bij voorkeur een gevriesdroogde suspensie van *Rhodospirillum* cellen. Werkwijze voor het droogvriezen van bacteriesuspensies zijn bij de vakman bekend en omvatten doorgaans de aanwezigheid van een vriesdroogmedium dat de cellulaire integriteit in stand houdt zoals bijvoorbeeld een medium met een hoog koolhydraat

gehalte, zoals sucrose, palatinose en trehalose. Bij voorkeur omvat een werkwijze voor de bereiding van een preparaat van *Rhodospirillum* spp. daarom een stap van het verwerken van de cellen van genoemde culture tot een preparaat van levende *Rhodospirillum* spp.

5 Een dergelijk preparaat van levende *Rhodospirillum* spp. kan zeer geschikt worden toegepast als een klassiek probioticum, dat hierin is gedefinieerd als een levend voedingssupplement dat een positieve invloed heeft op de gastheer door een verbetering van de intestinale microbiële balans (Fuller, 1989, J. Appl. Bacteriol. 66:365-78).

10 Een werkwijze voor de bereiding van een voedingssupplement volgens de uitvinding omvat het geschikt maken voor consumptie van een preparaat volgens de uitvinding door daaraan bestanddelen met voedingswaarde, olfactorische waarde, of textuurverbeterende eigenschappen zoals bovenomschreven toe te voegen. Een dergelijke
15 werkwijze kan het droog mengen van bestanddelen omvatten en het verpakken van het droge mengsel in een geschikte doseerverpakking.

Een voedingssupplement volgens de uitvinding kan zeer geschikt worden toegepast voor het verminderen van de cholesterolopname in de darm waardoor de bloedserum cholesterol spiegel verlaagd wordt.

20 Een andere uitvoeringsvorm van de uitvinding omvat de toepassing van een voedingssupplement in een voedingsmiddel met cholesterolverlagende eigenschappen.

Een werkwijze voor de bereiding van een cholesterolverlagend voedingsmiddel omvat het bereiden van een voedingsmiddel en het
25 verwerken daarin van een voedingssupplement. Een dergelijke werkwijze kan bijvoorbeeld de stap omvatten waarbij een voedingsmiddel op de normale wijze wordt toe bereid, waarna aan het toe bereide voedingsmiddel een preparaat van *Rhodospirillum* spp. kan worden toegevoegd. Verder is het mogelijk om een preparaat van *Rhodospirillum* spp. reeds tijdens de
30 bereiding aan het voedingsmiddel toe te voegen.

Een voedingsmiddel met cholesterolverlagende eigenschappen volgens de uitvinding omvat kenmerkend 0,1 tot 20 gew.%, bij voorkeur 1 tot 10 gew.%, van bovenbeschreven voedingssupplement.

5 De onderhavige uitvinding betreft in een laatste aspect een preparaat van *Rhodospirillum* spp. voor toepassing in een geneesmiddel voor het verlagen van de cholesterolspiegel in bloedserum. Bij voorkeur omvat een dergelijk preparaat de soort *Rhodospirillum rubrum*.

De uitvinding zal nu worden geïllustreerd aan de hand van de navolgende, niet als limitatief op te vatten, voorbeelden.

10

Voorbeeld 1. Productie van *Rhodospirillum rubrum*

Voor de productie van de gebruikte biomassa werd *R. rubrum* stam ATCC 25903 gebruikt. De gevriesdroogde cellen werden in medium R8AH (ATCC Medium 550) gerehydrateerd, en opgegroeid in Segers en Verstraete
15 medium (zie hierboven), met melkzuur (2,7 g/l) als koolstofbron, bij pH = 6,9 \pm 0,1. De uiteindelijke kweek van de biomassa die gebruikt werd in experimenten vond plaats in 20 liter bioreactoren in hetzelfde kweekmedium bij 30°C \pm 1, bij pH = 6,8 \pm 0,1, en bij constante belichting met tl-buizen (lichtintensiteit 300 μ M quanta. m⁻². s⁻¹) onder anaërobe
20 omstandigheden. De biomassa (3,4 g natgewicht/liter) werd na vijf dagen kweek geoogst via continue centrifugatie, opgeslagen bij -40°C, en drooggevroren.

Voorbeeld 2. Effect van *R. rubrum* in normaal gevoede ratten.

25

Mannelijke Wistar ratten werden gevoed met semi-synthetisch rattenvoer, dat alle essentiële voedingsbestanddelen (zoals gedefinieerd in referentie 1) bevatte (Hope Farms bv, Woerden, Nederland). Aan een groep van acht ratten werd dit basisvoer gegeven. Een tweede groep van acht ratten kreeg hetzelfde voer waaraan bovendien 10% (gew/gew)
30 gevriesdroogd *R. rubrum* was toegevoegd (uitgewisseld tegen sucrose). Beide

groepen aten nagenoeg evenveel voer (ca. 31 ± 7 gram/dag), en vertoonden dezelfde toename in lichaamsgewicht. Na acht weken waren alle gemeten klinisch-chemische parameters (plasma glucose, urinezuur, ureum, creatinine, GOT, GPT, Ht, Hb en urinair glucose en eiwit) in beide groepen
 5 gelijk, behalve het plasma cholesterolniveau en het plasma triglyceridenniveau. Plasma cholesterol was significant verlaagd in de met *R. rubrum* gevoede groep [$1,2 \pm 0,1$ mmol/L tegen $1,6 \pm 0,1$ mmol/L, ($p < 0,0001$)], evenals plasma triglyceriden [$0,5$ mmol/L $\pm 0,1$ mmol/L tegen $1,4 \pm 0,6$ mmol/L, $p < 0,0001$] (zie Figuur 1).

10 Scheiding van de lipoproteinen in het plasma m.b.v fast-protein-liquidchromatography (FPLC, AKTA systeem van Amersham) toonde aan dat de daling van cholesterol en triglyceriden een gevolg was van een daling in de LDL fractie, terwijl de HDL fractie in de met *R. rubrum* gevoerd dieren niet veranderd was (Figuur 2). De door *R. rubrum*
 15 veroorzaakte daling van plasma cholesterol was dus een specifieke LDL-cholesterol daling. De methoden voor het meten van cholesterol en triglyceriden, en voor het scheiden van lipoproteinen m.b.v. FPLC zijn beschreven in van Vlijmen et al. (1996) en Post et al. (2000).

20 Voorbeeld 3. Effect van *R. rubrum* in normaal gevoede muizen.

Tien C57Black/6 muizen werden gevoed met normaal semi-synthetisch muizenvoer gedurende zeven dagen. Vijf van deze muizen kreeg vervolgens gedurende zeven dagen hetzelfde voer, terwijl de andere vijf muizen gedurende zeven dagen hetzelfde voer met 10% (gew/gew) *R. rubrum* eraan toegevoegd kregen. De voerinnname verschilde niet significant
 25 tussen de twee groepen. De voedselopname was 2,6-2,8 gram /dag. In de met *R. rubrum* gevoede muizen was het plasmacholesterol na de zeven dagen $1,52 \pm 0,07$ mmol/L, significant (Student t-test; $p = 0,003$) lager dan in de controle groep ($1,86 \pm 0,15$ mmol/L) (Figuur 3).

Voorbeeld 4. Effect van *R. rubrum* in met "Western-type" dieet gevoede muizen.

5 Tien C57Black/6 muizen werden gedurende drie weken gevoed met een semi-synthetisch dieet, het zogenaamd "Western-type" dieet (dat 15 gew.% verzadigd vet en 0,25 gew.% cholesterol bevat) (Nishina et al., 1990).

Vervolgens werden vijf van deze muizen gedurende zeven dagen gevoed met hetzelfde dieetvoer, terwijl de andere vijf muizen gedurende zeven dagen hetzelfde dieetvoer kregen waaraan echter 10% (gew/gew) *R. rubrum* was toegevoegd [aan dit dieetvoer was tevens extra cholesterol toegevoegd om
10 het cholesterolgehalte op 0,25% (gew/gew) te houden]. Na deze zeven dagen was het cholesterolniveau in de met "Western-type" dieetvoer gevoede controlegroep $3,07 \pm 0,18$ mmol/L. In de muizen die gevoed waren met het met *R. rubrum* verrijkte "Western-type" dieetvoer was de cholesterolspiegel significant lager: $2,26 \pm 0,21$ mmol/L (Student t-test; $p=0,0003$) (Figuur 4).
15 Na scheiding van de lipoproteïnen met fast-protein-liquid-chromatography bleek in muizen die gevoed waren met 10% *R. rubrum* -bevattend "Western-type" voedsel, het LDL-cholesterol vrijwel verdwenen te zijn, terwijl het HDL cholesterol niet verschillend was (Figuur 5).

20 Voorbeeld 5. Effect van *R. rubrum* in met "Western-type" dieet gevoede transgene APOE*3-Leiden muizen.

In dit experiment werden muizen gebruikt, waarin het humane gen voor de zgn. Leidenmutatie van het apolipoproteïne E3 (APOE*3-Leiden) is ingebouwd via transgenese. Deze zgn. APOE*3Leiden muizen bezitten door
25 deze transgenese een gehumaniseerd lipoproteïnenprofiel en zijn zeer geschikt voor het bestuderen van effecten van verbindingen op het lipoproteïnenmetabolisme (van Vlijmen et al, 1996, 1998).

De opzet van de proef was als volgt: muizen werden gedurende vijf
30 weken gevoed met een "Western-type" dieet (zie boven) dat 0,25% (gew/gew) cholesterol bevatte. Hierdoor steeg hun plasmacholesterolspiegel tot 13 à 14

mmol/L. Vervolgens werden de muizen op basis van hun plasmacholesterol waarden ingedeeld in groepjes van zes muizen, en gevoed met hetzelfde dieet waaraan echter *R. rubrum* was toegevoegd in hoeveelheden van 0, 0,625, 1,25, 2,5, 5 of 10% (gew/gew). Hierbij werd door toevoegen van extra
 5 cholesterol aan het voer het cholesterolgehalte van het voer op 0,25% (gew/gew) gehouden.

Gedurende het gehele experiment werd lichaamsgewicht en voedselopname gemeten. Na de wisseling in dieet werd wekelijks bloed afgenomen uit de staart om de cholesterol- en triglyceridenspiegels in het
 10 bloedplasma te bepalen. Ook werd (groepsgewijs) het lipoproteïnenpatroon bepaald mbv FPLC. Tevens werd gedurende een week per groep faeces verzameld. Na drie weken werd, terminaal, in de groepen gevoed met 0 en 10% *R. rubrum*, de secretie van very-low-density-lipoproteïnen gemeten (Post et al., 2000). Tevens werd op hetzelfde tijdstip (3 weken) van de vier
 15 overgebleven groepen de groep gevoed met 0,625% *R. rubrum* op het dieet zonder *R. rubrum* gezet, de groep gevoed met 2,5% *R. rubrum* op het dieet met 5% *R. rubrum*, en de groep gevoed met 5% *R. rubrum* op het dieet met 10% *R. rubrum*, ter vervanging van de opgeofferde groepen. Een week later werd in alle overgebleven groepen nogmaals bloed afgenomen ter bepaling
 20 van lipiden.'

De resultaten kunnen als volgt samengevat worden:

- de plasmaconcentratie van cholesterol was significant verlaagd in de groepen die gevoed waren met voer waarin 5% of 10% *R. rubrum* verwerkt was (Figuur 6)
 25
- deze cholesterolverlaging was reeds na een week zeer significant in de 10% *R. rubrum* groep ($p < 0,0001$), en na twee weken ook in de 5% *R. rubrum* groep ($p < 0,001$), en bleef significant gedurende de drie weken van het experiment (Figuur 6)

• de cholesterolverlaging was het gevolg van een verlaging van het cholesterol in de VLDL en de LDL fracties, terwijl de hoeveelheid cholesterol in de HDL fractie niet veranderde (Figuur 7)

Om te bepalen of de cholesterol daling een gevolg was van een remming van de synthese van cholesterol werd de plasmaconcentratie van lathosterol, een bijproduct van de cholesterol synthese, gemeten (Kempen et al, 1988). De lathosterolconcentratie was niet significant verschillend tussen de groepen gevoed met 0, 5 of 10% *R. rubrum*, terwijl de groepen gevoed met 5 en 10% *R. rubrum* daarentegen wel significant verlaagde plasma cholesterolconcentraties lieten zien (Figuur 8). De ratio van plasma lathosterol over plasma cholesterol steeg zelfs significant in de met *R. rubrum*-gevoede muizen t.o.v. de controle muizen (ANOVA; $p=0,026$). Daar de (relatieve) lathosterolconcentratie in plasma een maat is voor de synthesesnelheid van cholesterol (Kempen et al, 1988) kan hieruit geconcludeerd worden dat de gemeten cholesterolverlaging in plasma niet een gevolg was van een verminderde synthesesnelheid van cholesterol.

De plasmaconcentraties van campesterol en β -sitosterol, sterolen die alleen in planten voorkomt en dus alleen via de darm opgenomen worden daalden in de met 5% of 10% *R. rubrum* bevattend voer gevoerde groepen significant (Figuur 9). De ratio van de plasmaconcentratie van β -sitosterol over cholesterol in plasma verschilde echter niet significant tussen deze drie groepen (ANOVA; $p=0,26$), evenmin als de ratio van de concentratie van campesterol over cholesterol in plasma (ANOVA; $p=0,98$). Daar plasma cholesterolconcentraties bepaald worden door synthesesnelheid en absorbtie uit de darm, toont het gelijk blijven van deze ratio's aan dat de daling van de plasma cholesterolconcentratie niet uitsluitend een gevolg kan zijn van verlaagde synthese (dan zou de ratio stijgen), maar eerder een gevolg van een verminderde absorptie van sterolen uit het darmlumen.

De synthese van VLDL door de lever (gemeten zoals beschreven door Post et al., 2000) was niet significant veranderd in de groep die gevoed was met 10% *R. rubrum* t.o.v. de controlegroep (Figuur 10). Hoewel, na remming van de VLDL-triglyceridenafbraak m.b.v. Triton WR 1339, de
 5 toename van plasmatriglyceriden groter was in de met 10% *R. rubrum* gevoede groep dan in de controlegroep (Figuur 10a) moet dit toegeschreven worden aan de toegenomen hoeveelheid triglyceriden in de VLDL fractie van de met *R. rubrum* gevoede muizen (Figuur 10b), en niet van een toename van de secretie van VLDL deeltjes.

10 De faecale excretie van neutrale sterolen (vooral cholesterol) nam toe in de met *R. rubrum* gevoede muizen (Figuur 11), terwijl de ook secretie van galzuren in de faeces licht toenam (Figuur 12). Als gevolg hiervan nam de excretie van alle sterolen samen (neutrale sterolen plus galzuren) toe. (Figuur 13).

15 Samenvattend: uit deze proeven volgt dat toevoeging van 5% of 10% (gew/gew) *R. rubrum* aan voer in APOE*3Leiden muizen de plasmaspiegel van serum cholesterol significant verlaagt, en dat deze verlaging (i) volledig is toe te schrijven aan een verlaging van cholesterol in de VLDL en LDL fracties, terwijl HDL cholesterol niet verandert, (ii) niet
 20 een gevolg is van een afname van de cholesterol synthese, daar de VLDL synthese/secretie en de cholesterol synthese niet afnemen, (iii) niet een gevolg is van toegenomen secretie van galzuren, die slechts licht toeneemt, maar (iv) een gevolg van een afgenomen opname van cholesterol uit de darm, wat blijkt uit de toename van de cholesterol excretie in de faeces (zie
 25 Tabel) en uit de afname van de plasmaspiegels van campesterol en sitosterol.

Tabel 1

% <i>R. rubrum</i> in voer	Cholesterol balans			
	INPUT cholesterol in voer	OUTPUT sterolen uitgescheiden	OUTPUT galzuren uitgescheiden	OUTPUT totaal uitgescheiden
0	78	38	14	52
0,625	78	41	18	59
1,25	78	52	17	69
2,5	78	48	15	63
5	78	63	17	80
10	78	68	25	93

Tabel 2

% <i>R. rubrum</i> in voer	Cholesterol absorptie		
	µmol per 100g per dag	als % van input	als % van controlegroep
0	40	51	100
0,625	37	48	93
1,25	26	33	64
2,5	30	38	75
5	15	19	37
10	10	12	24

5

In de transgene APOE3*Leiden muizen (die een gehumaniseerd lipoproteïnenmetabolisme bezitten) verlaagde *R. rubrum* het plasma cholesterol met 39% na een week, en met 55% na twee weken voeding met voer dat 10% (w/w) *R. rubrum* bevatte, en met respectievelijk 16% en 25% na voeding met voer dat 5% (w/w) *R. rubrum* bevatte. Daar *R. rubrum*

10

alleen het in niet-HDL deeltjes aanwezige cholesterol verlaagde is de verlaging van het atherogene cholesterol nog beduidend groter.

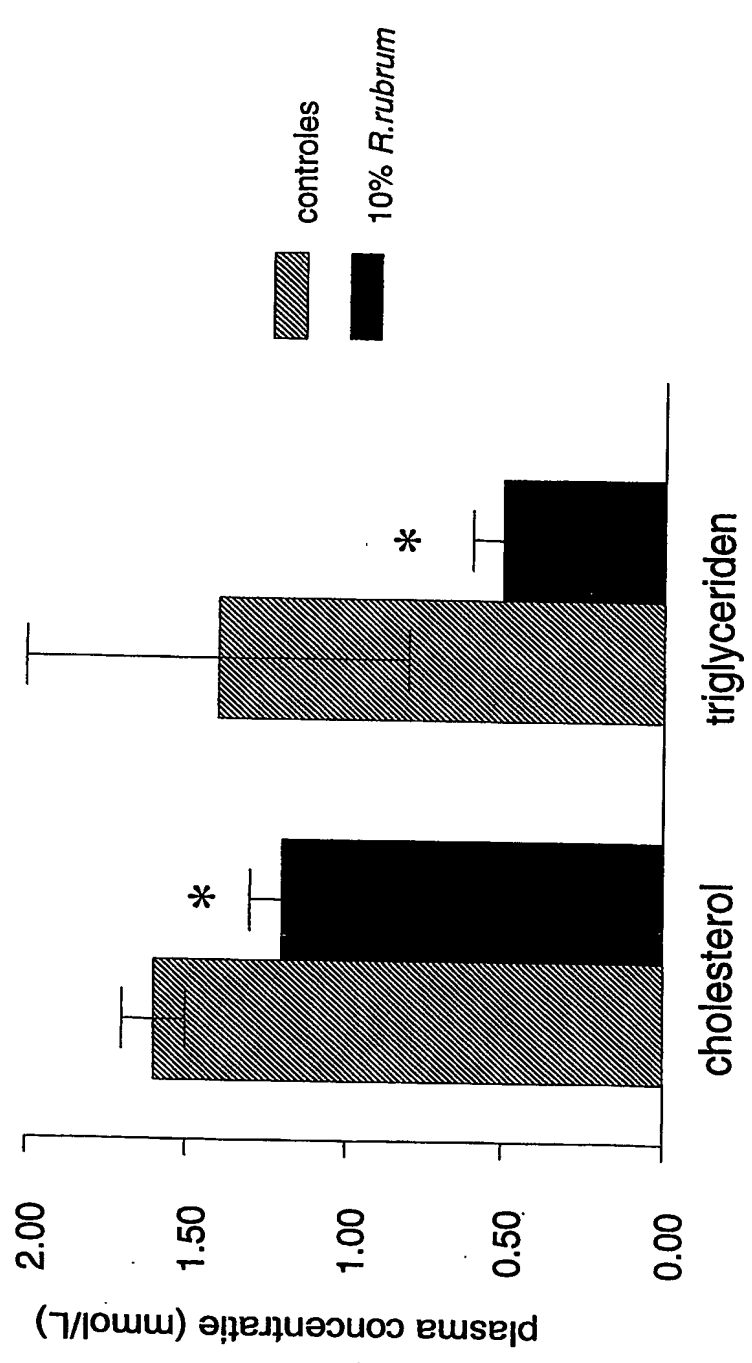
CONCLUSIES

1. Preparaat van *Rhodospirillum* spp. voor toepassing in een geneesmiddel.
2. Preparaat volgens conclusie 1, omvattende levende *Rhodospirillum* spp.
- 5 3. Farmaceutisch preparaat omvattende een preparaat van *Rhodospirillum* spp. en één of meer excipiëntia.
4. Cholesterol verlagend middel omvattende een preparaat van *Rhodospirillum* spp.
5. Toepassing van een preparaat van *Rhodospirillum* spp. voor de
10 vervaardiging van een geneesmiddel voor het verlagen van de cholesterolspiegel in bloed.
6. Voedingssupplement met cholesterolverlagende eigenschappen omvattende een preparaat van *Rhodospirillum* spp.
7. Probioticum met cholesterolverlagende eigenschappen omvattende
15 een preparaat van levende *Rhodospirillum* spp.
8. Voedingsmiddel omvattende een voedingssupplement volgens conclusie 6.
9. Werkwijze voor de bereiding van een preparaat van *Rhodospirillum* spp. omvattende het opkweken van cellen van één of meer
20 *Rhodospirillum* spp. tot een culture, het oogsten van genoemde culture en het verwerken van de cellen van genoemde culture tot een preparaat.
10. Werkwijze volgens conclusie 9, omvattende de stap van het verwerken van de cellen van genoemde culture tot een preparaat van levende *Rhodospirillum* spp.
- 25 11. Werkwijze voor de bereiding van een voedingssupplement volgens conclusie 6, omvattende het geschikt maken voor consumptie van een preparaat volgens conclusie 1 of 2.

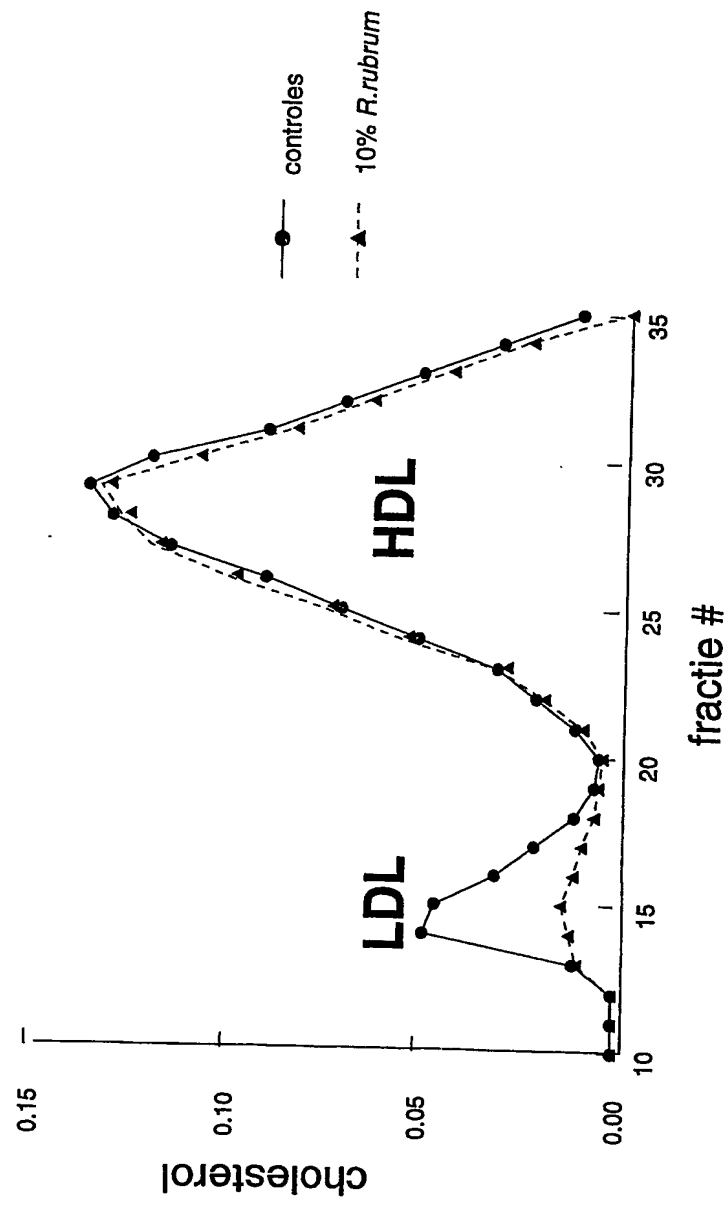
12. Werkwijze voor de bereiding van een voedingsmiddel volgens conclusie 8, door in een voedingsmiddel een voedingssupplement volgens conclusie 6 te verwerken.

222153

Figuur 1

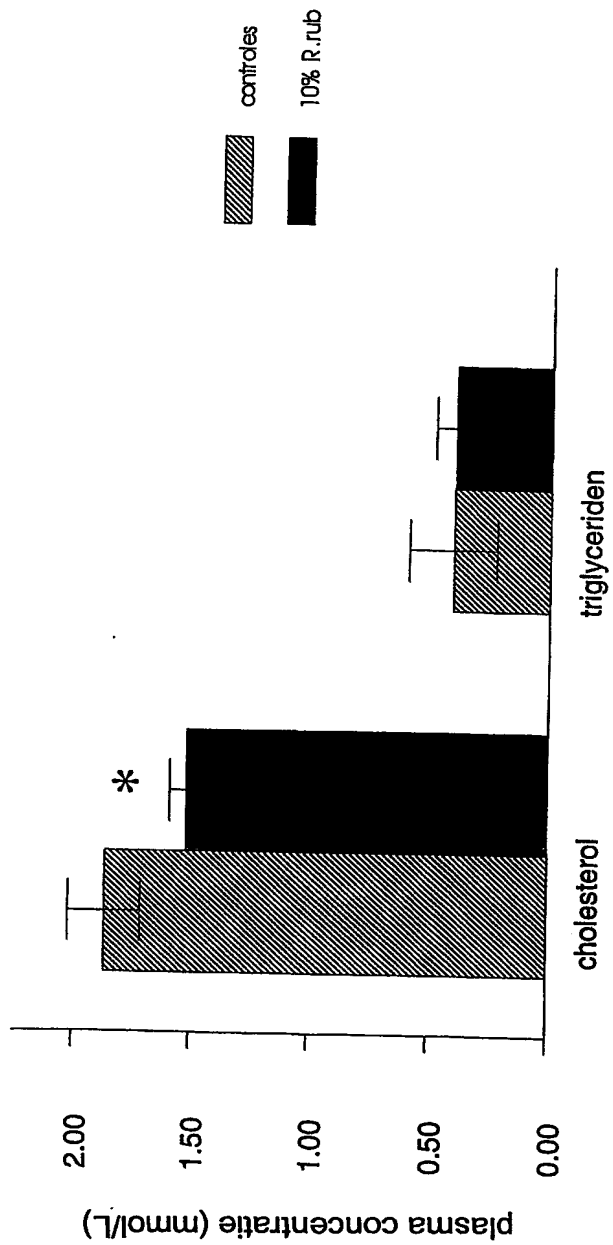


Figuur 2

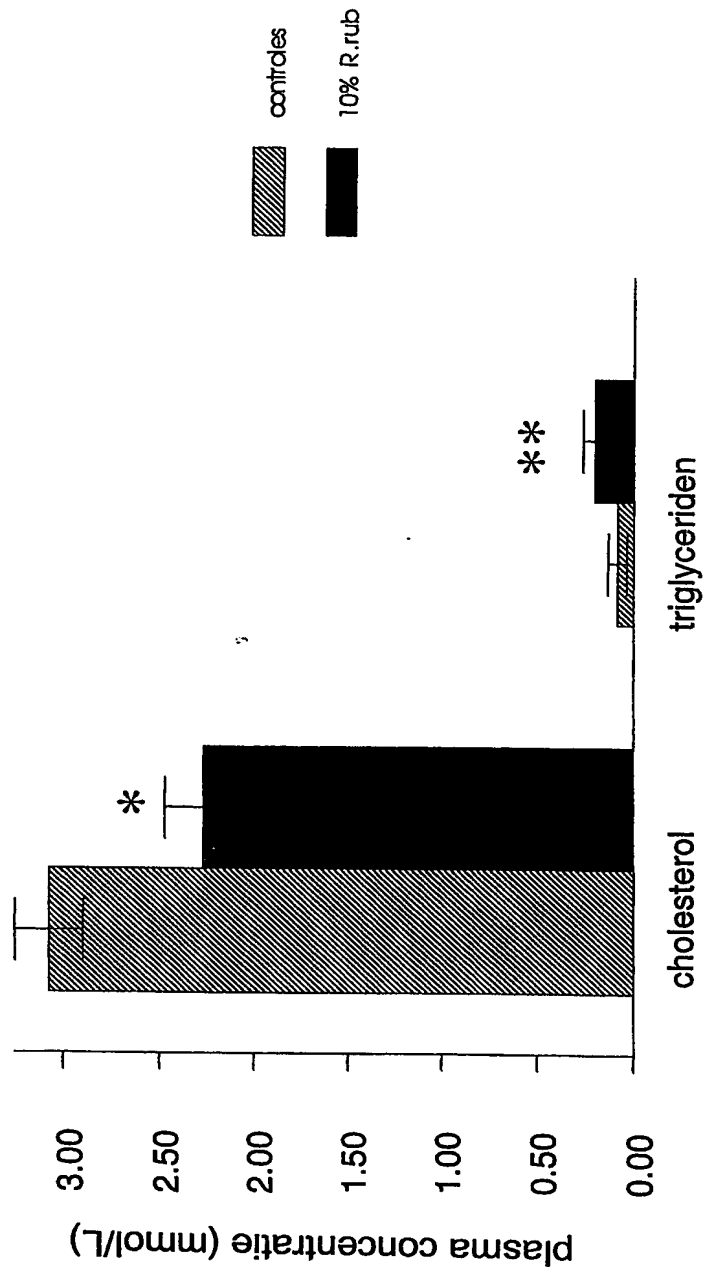


1022153

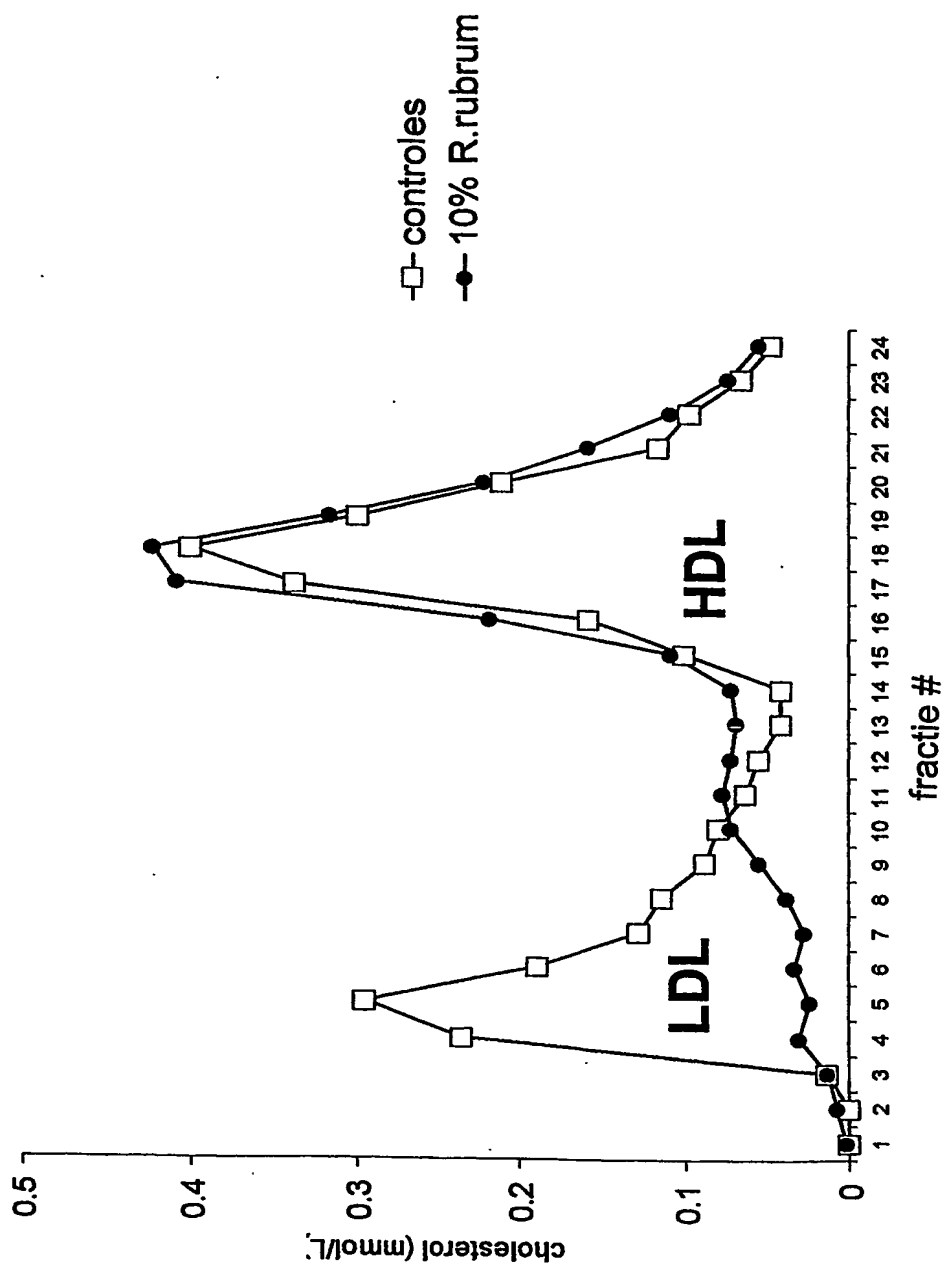
Figuur 3



Figuur 4

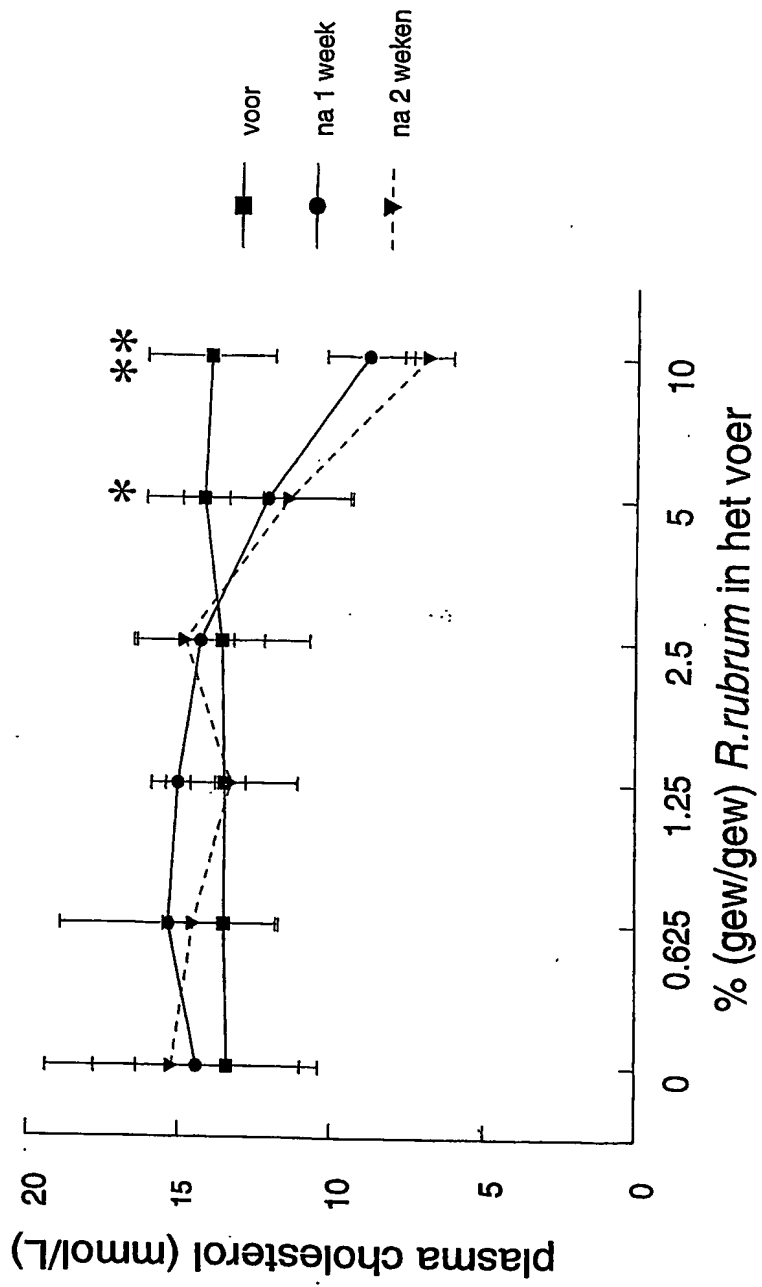


Figuur 5

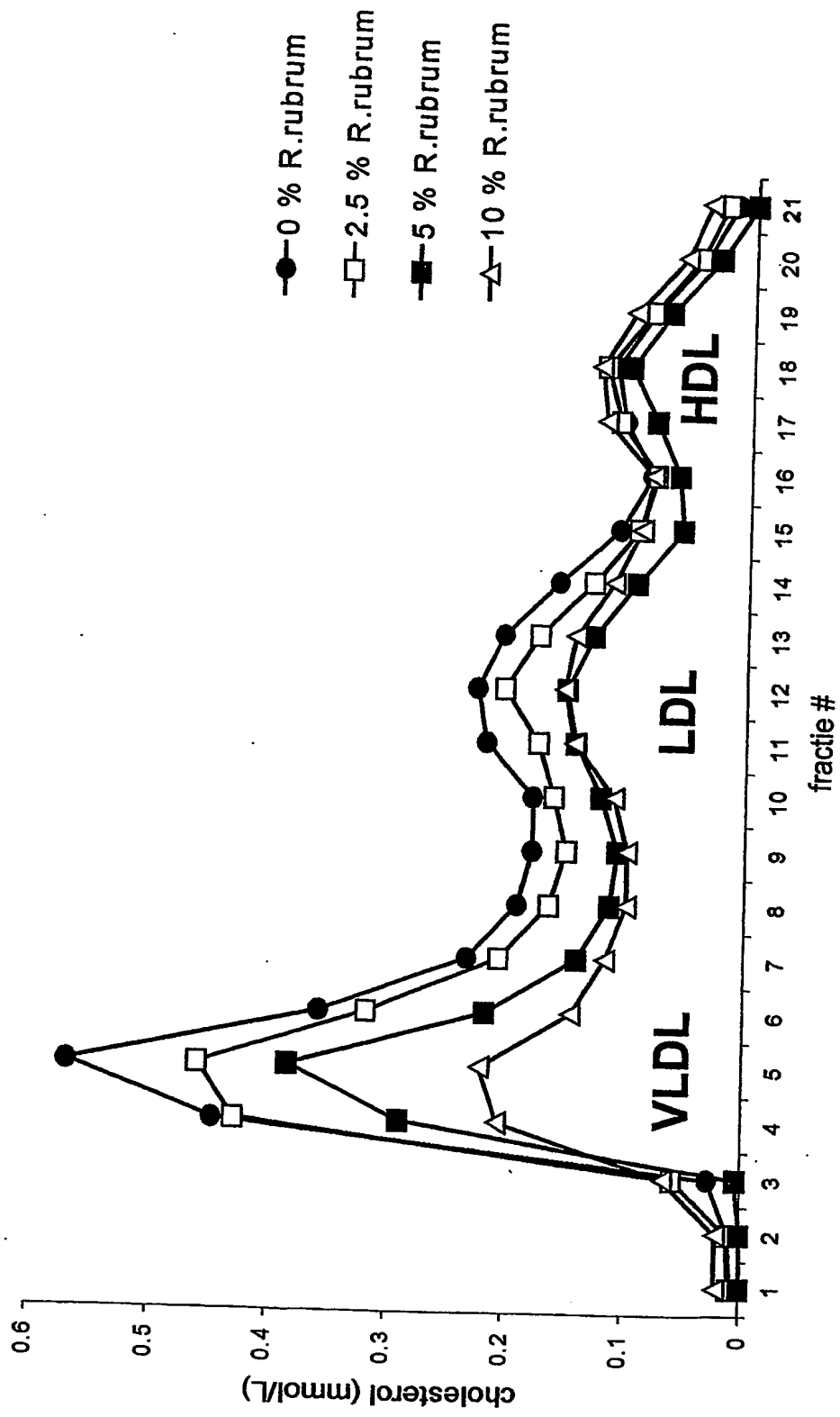


1022153

Figuur 6



Figuur 7



0022153

Figure 8:

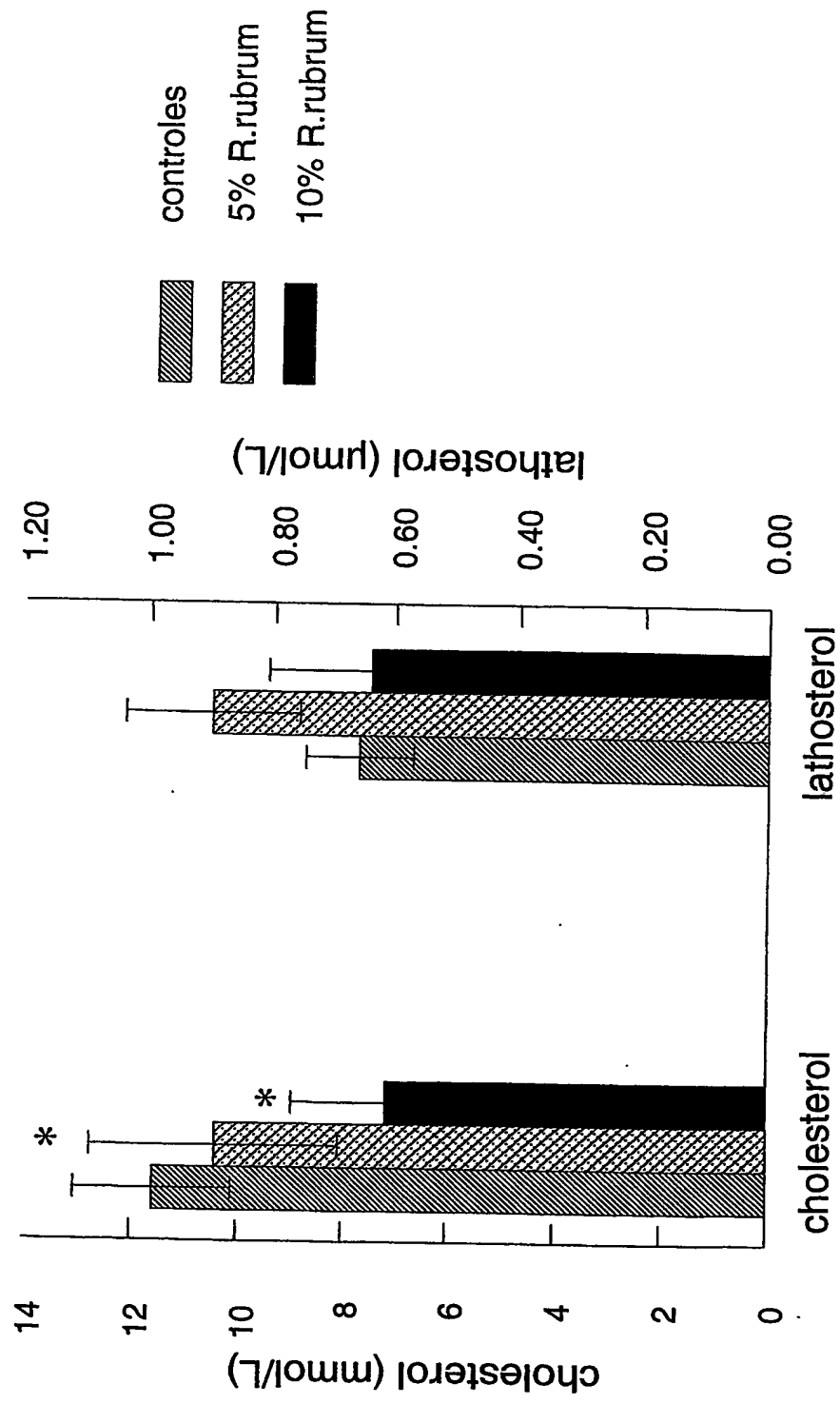


Figure 9

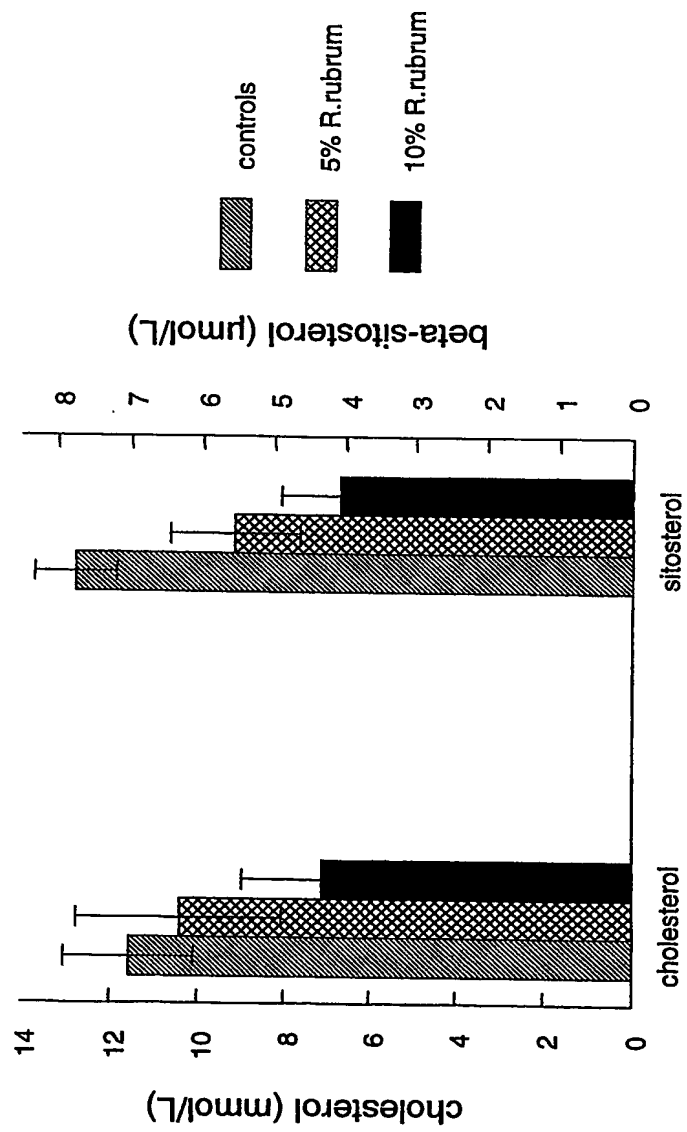
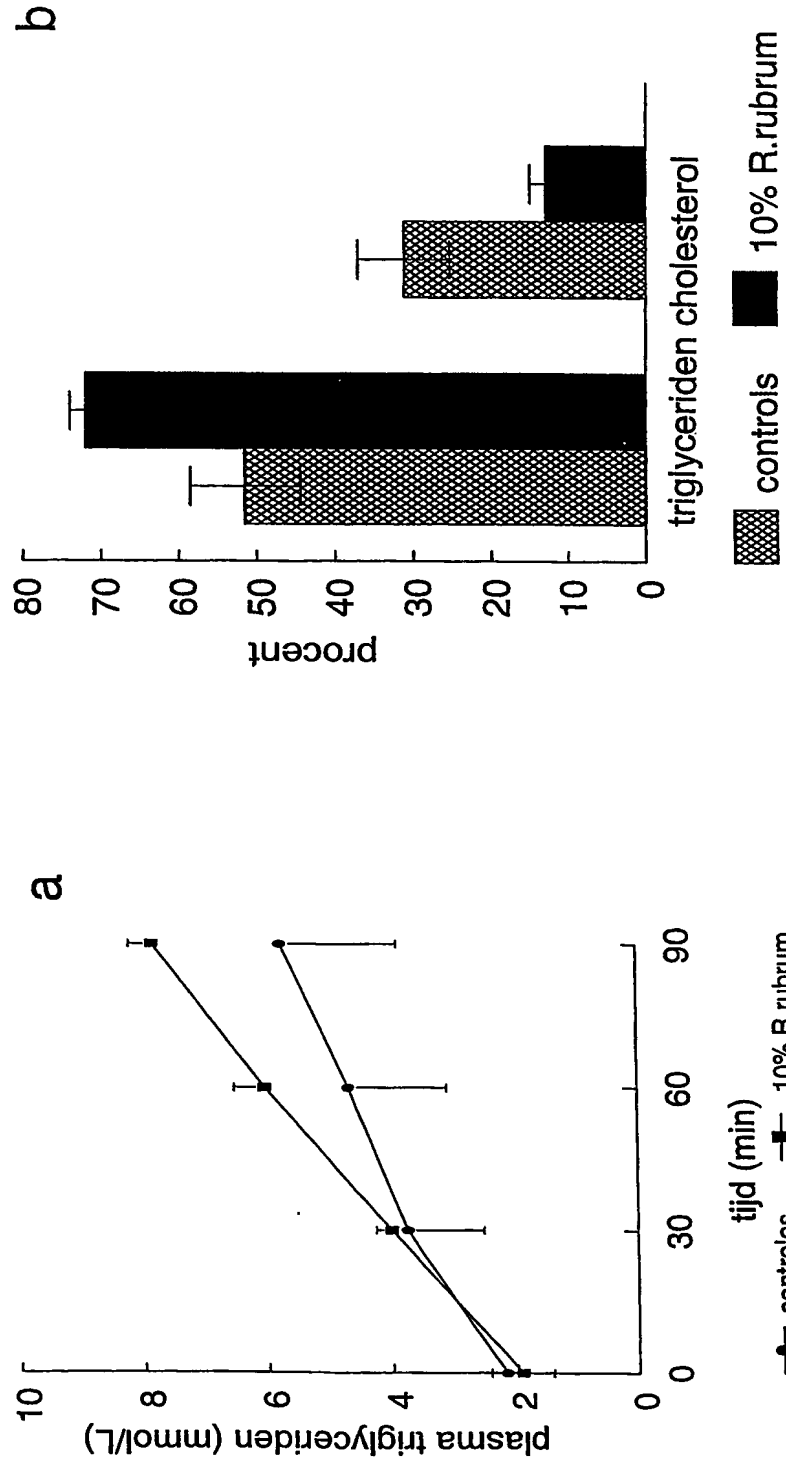
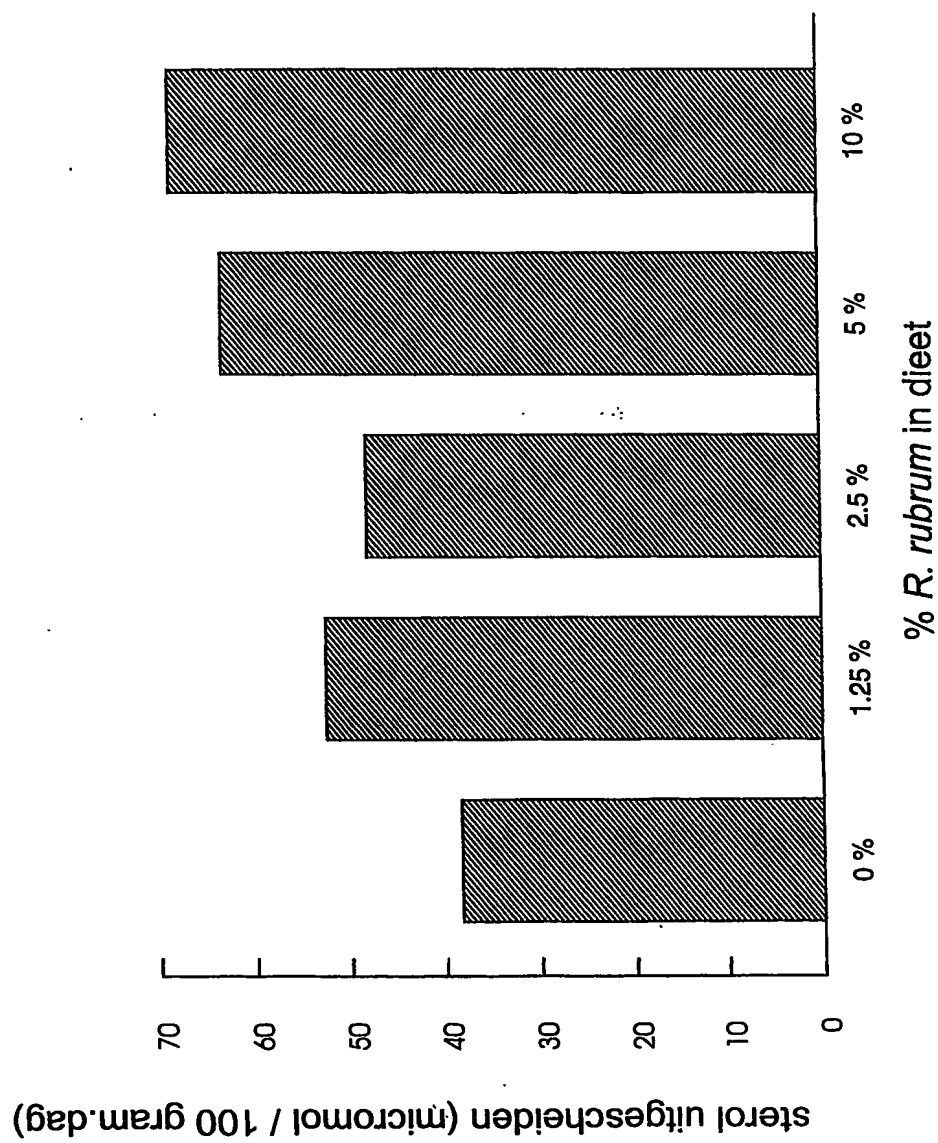


Fig 10



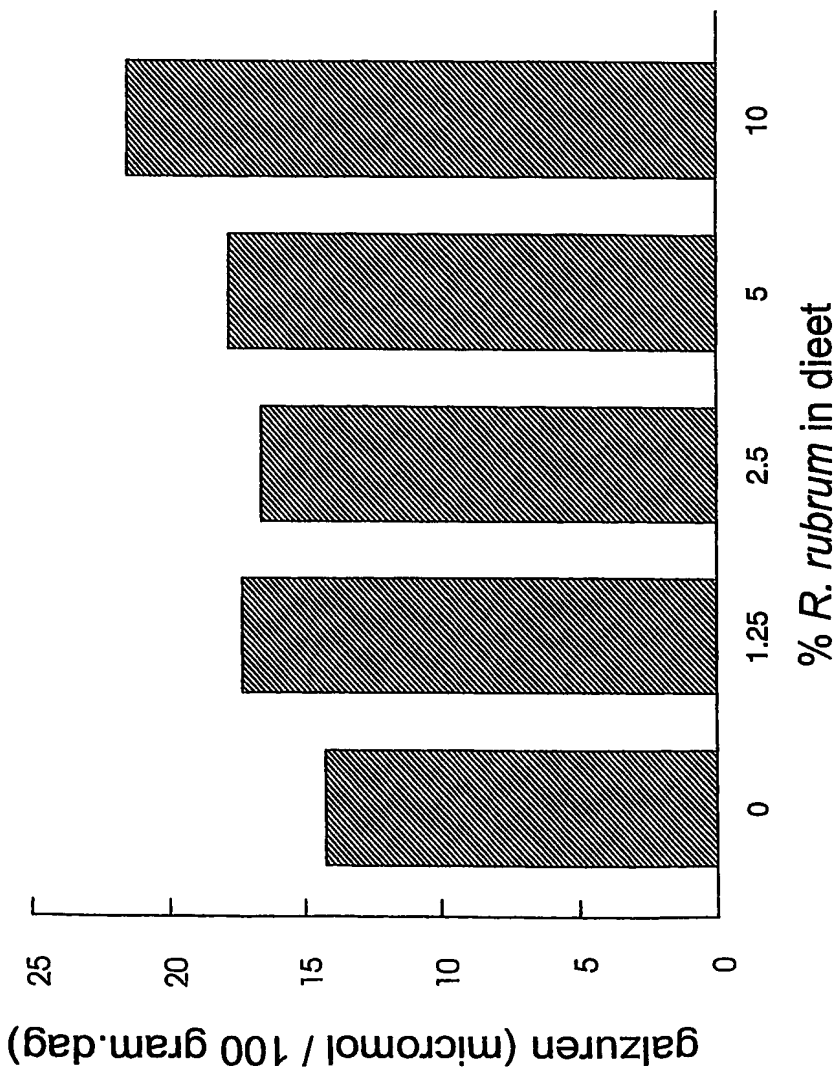
1-022153

Figuur 11

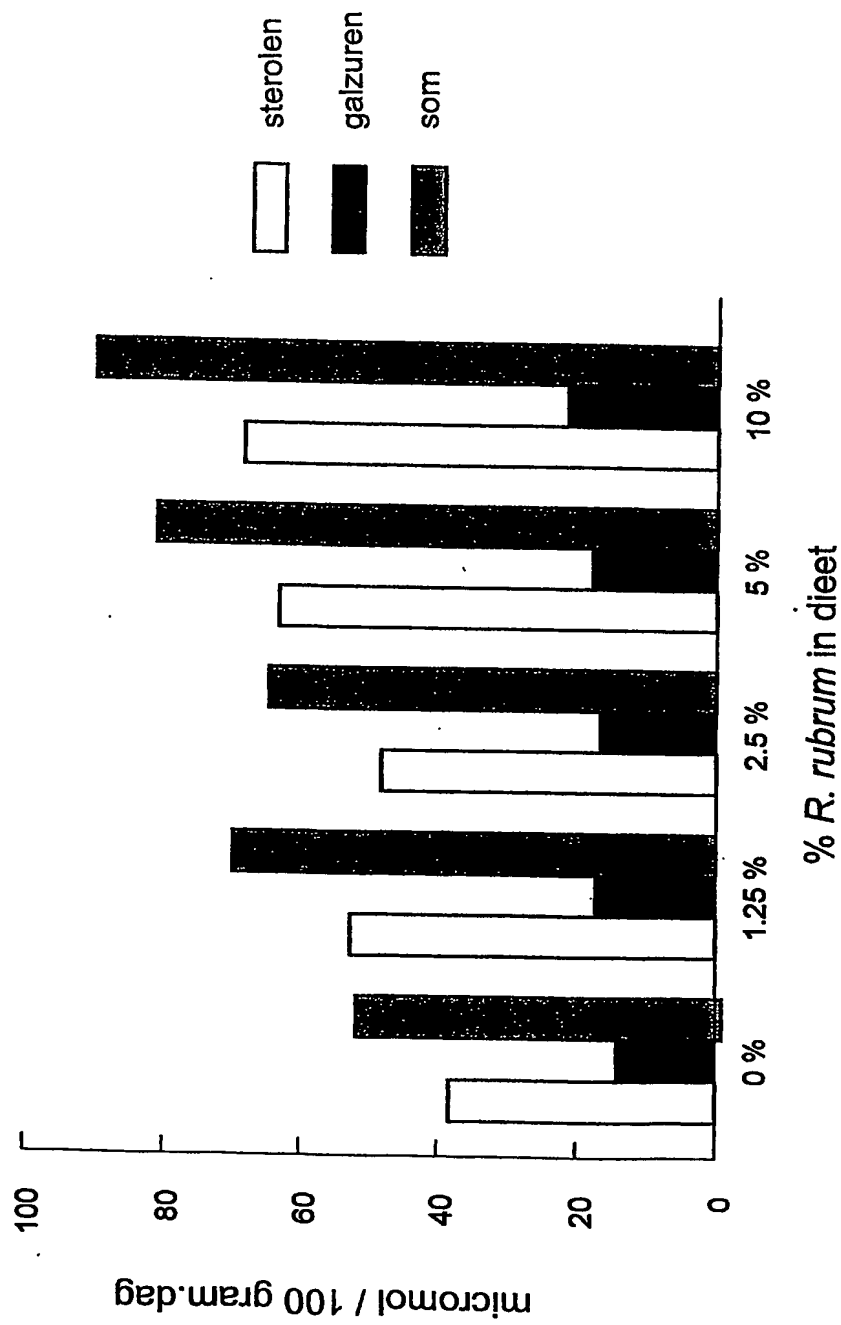


1022153

Figuur 12



Figuur 13



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.